

REC'D 17 APR 2004

WIPO PCT

PCT/KR 2004/000781

RO/KR 03.04.2004

Rec'd PCT/PTO 03 OCT 2005

10/551764



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0021122
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 04월 03일
Date of Application
APR 03, 2003

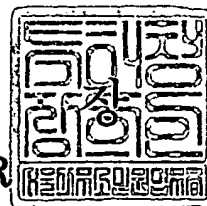
출원 인 : 한미약품 주식회사
Applicant(s) HANMI PHARM. IND. CO., LTD.



2004 년 03 월 05 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.04.03
【발명의 명칭】	생체내 반감기가 증가된 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체 및 이의 제조방법
【발명의 영문명칭】	PEG-BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE HOMODIMER CONJUGATE HAVING ENHANCED HALF LIFE IN BLOOD AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF
【출원인】	
【명칭】	한미약품 주식회사
【출원인코드】	1-1998-004411-2
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	1999-056327-8
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	1999-023919-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김영민
【성명의 영문표기】	KIM,Young Min
【주민등록번호】	690813-1148928
【우편번호】	449-901
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 고매리 877 매화마을 우남드림밸리 102동 803 호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김대진
【성명의 영문표기】	KIM,Dae Jin
【주민등록번호】	741128-1066712

【우편번호】	137-049
【주소】	서울특별시 서초구 반포본동 구반포 APT 28-402
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	배성민
【성명의 영문표기】	BAE, Sung Min
【주민등록번호】	730529-1109410
【우편번호】	151-054
【주소】	서울특별시 관악구 봉천4동 1587-8 303호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임창기
【성명의 영문표기】	LIM, Chang Ki
【주민등록번호】	700104-1156311
【우편번호】	463-500
【주소】	경기도 성남시 분당구 구미동 20
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김경배
【성명의 영문표기】	KIM, Kyeong Bae
【주민등록번호】	770224-1559711
【우편번호】	151-810
【주소】	서울특별시 관악구 봉천6동 100-435
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권세창
【성명의 영문표기】	KWON, Se Chang
【주민등록번호】	630620-1024818
【우편번호】	143-815
【주소】	서울특별시 광진구 광장동 현대8차 802동 2205호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이관순

【성명의 영문표기】 LEE, Gwan Sun

【주민등록번호】 600110-1471553

【우편번호】 138-739

【주소】 서울특별시 송파구 오금동 우창아파트 3동 404호

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 이현실 (인) 대리인
 장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 12 면 12,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 9 항 397,000 원

【합계】 438,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 두 분자의 생리활성 폴리펩티드의 아미노 말단이 한 분자의 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycol, PEG) 링커에 의해 연결된 동종이량체 (homodimer)를 형성하고, 상기 동종이량체를 구성하는 각각의 생리활성 폴리펩티드의 라이신 잔기의 아미노기에 한 분자씩의 PEG가 수식되어 생체내 잔류 시간이 증가되어 생물학적 활성을 높은 수준으로 유지할 수 있는 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

생체내 반감기가 증가된 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체 및 이의 제조방법
{PEG-BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE HOMODIMER CONJUGATE HAVING ENHANCED HALF LIFE IN
BLOOD AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 따라 제조된 hGH 동종이량체 및 PEG-hGH 동종이량체 결합체의 SDS-PAGE 젤 사진이고,

도 2a는 본 발명에 따라 제조된 PEG-hGH 동종이량체 결합체의 혈중 반감기를 모노-PEG-hGH와 비교하기 위한 약물동력학 그래프이고,

도 2b는 본 발명에 따라 제조된 PEG-IFN 동종이량체 결합체의 혈중 반감기를 모노-PEG-IFN와 비교하기 위한 약물동력학 그래프이고,

도 2c는 본 발명에 따라 제조된 PEG-GCSF 동종이량체 결합체의 혈중 반감기를 모노-PEG-GCSF와 비교하기 위한 약물동력학 그래프이고,

도 3은 본 발명에 따라 제조된 PEG-hGH 동종이량체 결합체의 생체내 활성을 모노-PEG-hGH와 비교하기 위하여 뇌하수체가 제거된 랫트를 이용한 몸무게 증가 시험 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<6> 본 발명은 두 분자의 생리활성 폴리펩티드의 아미노 말단이 한 분자의 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycol, PEG) 링커에 의해 연결된 동종이량체 (homodimer)를 형성하고, 상기 동종이량체를 구성하는 각각의 생리활성 폴리펩티드의 라이신 잔기의 아미노기에 한 분자씩의 PEG가 수식된 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체에 관한 것이다.

<7> 뇌하수체 전엽에서 분비되는 인간 성장 호르몬 (human growth hormone, hGH)은 당화되어 있지 않은 펩타이드 호르몬으로서, 인체 여러 조직의 수용체에 결합하여 다른 성장 인자의 분비를 촉진하거나 또는 직접 작용하여 인체 여러 부위의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 현재에는 성장 호르몬 결핍증 및 터너 증후군 (Turner syndrome)으로 인한 왜소증 치료와 성인의 성장 호르몬 결핍증, 만성 신장 부전 (Chronic Renal Insufficiency, CRI) 등의 치료에 사용되고 있고, 골다공증 (Osteoporosis), 상처, 화상 및 불임 등에 대해서도 임상시험이 행해지고 있어 인간 성장 호르몬을 적용하는 질환이 크게 늘어날 것으로 보인다. 인간 성장 호르몬은 짧은 혈중 반감기 때문에 환자에게 1주일에 3번, 또는 매일 1회 피하 주사로 투여되어야 적절한 혈청 수준을 유지할 수 있다. 인간 성장 호르몬을 만성적으로 수용하는 환자는 빈번한 피하 주사로 인한 삶의 질 저하 및 항체 형성 내지 불균등한 기관 성장 (differential organ growth) 등과 같은 복합병 유발 등의 문제가 야기될 수 있다 (Haffner D., Schaefer, F., Girard, J., Ritz, E. and Mehls, J. Clin. Invest. 0.93:1163, 1994).

<8> 이러한 인간 성장 호르몬의 반복 주입과 관련된 문제를 해결하기 위해, 인간 성장 호르몬의 생물학적 활성을 유지하면서 생체내 잔류기간을 증가시키기 위한 여러 연구가 진행되었다. 그 중 인간 성장 호르몬을 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드와 같은 생체 적합성 (biocompatibility) 및 생분해성 중합체 매트릭스 내에 캡슐화하여 1주일 이상에 걸쳐 생체내에서 방출하는 서방성 방출 (sustained release) 제형 조성물로 제조하는 연구가 시도되어 여러 가지 생분해성 중합체의 조합과 캡슐화 연구가 진행되었고, 제넨텍 (Genentech)사는 뉴트로핀 데포트 (Nutropin Depot)이라는 상품명으로 이를 판매하고 있다. 그러나, 이들 조절 방출 장치는 인간 성장 호르몬을 과량으로 투여해야 하며, 생체내에서 종종 초기에는 과량 방출되고 그 후에는 소량 방출되기도 한다. 또한, 이들 조절 방출 장치 내에서의 인간 성장 호르몬의 농도가 높아지면 호르몬 분자가 수일후에 응집되어 생물학적 활성이 감소되고 생체내에서 면역원으로 작용하게 되는 단점을 가진다.

<9> 인간 성장 호르몬을 비롯한 단백질 의약품, 예를 들면 인터페론 알파 2b, 과립구 군체 자극인자 (G-CSF) 등의 생체내 잔류기간을 증가시키기 위해 단백질을 PEG와 같은 합성 고분자와 결합시키는 방법이 시도되었다. 단백질 의약품을 합성 고분자와 결합시키면 단백질 분자의 표면 특성이 변화되어 물 또는 유기용매에 대한 용해도를 증가시킬 수 있다. 또한, 이로 인해 단백질 약물의 생체 적합성을 증가시켜 면역 반응성을 감소시키고, 생체내에서의 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라 장관 시스템, 신장, 비장 또는 간에 의한 소실 (clearance)이 보다 천천히 이루어질 수 있다. 단백질과 PEG가 결합되었을 때 상기와 같은 장점으로 인하여 부작용이 많이 감소하는 것은 사실이지만, 동시에 PEG와 결합한 후에는 그 단백질의 생체 활성도가 무척 감소한다는 단점을 나타낸다.

<10> 현재까지 많이 사용되고 있는 PEG는 단백질 표면의 하나 이상의 자유 라이신 (lysine) 잔기와 공유결합을 하여 PEG가 단백질의 표면에 부착되는데, 이때 단백질의 표면 중 단백질의 활성과 직접적으로 관계가 있는 부위가 PEG와 결합하면 그 활성이 감소하게 된다. 또한, PEG와 라이신 잔기의 결합은 대개 무작위적으로 일어나므로 많은 종류의 PEG화된 단백질 결합체들이 혼합물로 존재하게 되고, 결과적으로 원하는 결합체를 순수하게 분리하는 과정이 복잡하고 어려워진다. 예를 들어, 인간 성장 호르몬은 그 표면에 10개의 자유 라이신 잔기가 존재하는데 이 잔기들 중 어느 것과 PEG가 결합하는 경우에 인간 성장 호르몬의 생물학적 활성을 유지하느냐가 최근 연구의 초점이 되고 있다.

<11> 이러한 연구의 일환으로 생체 활성 폴리펩티드의 N-말단을 특이적으로 페길레이션 (pegylation)시키는 방법이 활성유지를 위한 방법으로 사용되었다. 제넨텍 (Genentech)사의 논문 [Clark et al., *The Journal of Biological Chemistry* 271:21969, 1996) 및 국제 특허 공개공보 제WO 93/00109호는 인간 성장 호르몬을 면역 반응 촉진제로 사용할 때 PEG로 수식화된 형태로 사용할 수 있다는 내용을 개시하고 있으며, 공지된 다양한 페길레이션 방법 (P. McGoff et al., *Chem. Pharm. Bull.* 36:3070, 1988; Chamow, S. M. et al., *Bioconjugate Chem.* 5:133, 1994; Teh, L. C. and Chapman, G. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 150:391, 1988)을 통해 인간 성장 호르몬에 PEG를 결합시켰다. 이때, 시험에 사용된 PEG는 분자량이 5,000 kDa이었으며, 전골수 세포주 (premyeloid cell line)인 FDC-P1을 사용한 세포 증식 분석을 통해 인간 성장 호르몬 한 분자당 결합된 PEG 분자의 수가 증가할수록 그 활성이 감소됨을 확인하였다. 미국 특허 제5,766,897호 및 국제 특허 공개공보 제WO 00/42175호는 인간 성장 호르몬과 PEG를 결합시킴에 있어서 PEG가 인간 성장 호르몬의 활성부위와 반응하는 것을 피하기 위하여 PEG-말레이미드를 사용하여 PEG가 시스테인과 선택적으로 반응하도록 하였다. 그러나, 이

러한 종류의 PEG를 사용하려면 인간 성장 호르몬에 이황화 (disulfide) 결합에 관여하지 않은 자유 시스테인 잔기가 있어야 되나 인간 성장 호르몬에 존재하는 4개의 시스테인 잔기는 모두 이황화 결합에 참여하고 있으므로 인간 성장 호르몬에 인위적으로 시스테인 잔기가 삽입된 인간 성장 호르몬 변형체를 사용하여 폐길레이션 반응을 수행하였다. 하지만, 상기 방법은 폐길레이션 반응에 사용한 인간 성장 호르몬이 천연형이 아니며, 또한 자유 시스테인이 존재하는 단백질을 발현시키고 정제하는 과정이 통상적으로 용이하지 않기 때문에 원료 물질을 수득하기가 어렵다는 문제점이 있다.

<12> 인터페론 알파와 과립구 군체 자극인자의 경우는 위치 선택적으로 N-말단에 폐길레이션 시킨 방법이 보고된 바 있다. 미국 특허 제5,985,265호에 의하면, 과립구 증식인자의 N-말단에는 분자량 20,000 PEG-알데히드를, 컨센서스 (consensus) 인터페론 알파의 N-말단에는 분자량 12,000 PEG-알데히드를 각각 결합시켰다. 상기 결합 반응으로 한 개의 PEG만이 N-말단에 결합하게 되며, 인터페론의 경우 약 20% 시험관내 활성을 보였다. 혈중 반감기에 대한 구체적인 결과는 보고되지 않았으나, 비교적 작은 분자량의 PEG를 사용하였고 하나의 PEG만 수식하였기 때문에 혈중 반감기 개선효과는 크지 않을 것으로 보여진다.

<13> 현재까지 보고된 서방형 제제의 단점은 폐길레이션으로 인한 활성 감소를 줄이기 위해 위치 선택적으로 N-말단 또는 그 이외의 한 부위에만 PEG를 수식하게 되는 경우에는 초기 방출되는 양이 너무 과도하고, 방출되는 속도를 줄이기 위해 여러 아미노산 잔기를 폐길레이션시키는 경우에는 매우 낮은 활성으로 생체내 효과가 거의 나타나지 않는다는 것이다. 즉, 생체내 효과가 약물 투여직후 높게 유지되었다가 다시 감소하는 현상을 보여 매일 1회 투여하는 방법과 유사하게 나타나지 않는다는 점이다. 따라서, 초기 높은 활성증가는 줄이고 1주 이상 일정한 효과를 유지하기 위한 방법이 필요하다. 적용하는 생리활성 폴리펩티드에 따라 약간 다르

지만, 일반적인 폐길레이션 방법만으로 생체내 안정성을 증가시키기 위해서는 많은 수의 PEG를 수식해야 한다. 이 경우 잔류활성은 매우 작게 되어 생체내 효과를 기대할 수 없으므로, 혈중 반감기를 길게 유지하며 개선된 활성유지 효과를 얻을 수 있는 방법이 요구되고 있다.

<14> 한편, 생리활성 폴리펩티드의 활성증가 목적으로 동종이량체 효과는 여러 문헌에서 보고되었다. 일반적인 성장인자 (growth factor)는 유사한 3차원 구조를 가지고 있고, 이러한 성장인자는 대부분 동종이량체를 형성하면 개선된 생체활성을 얻을 수 있다.

<15> 미국 특허 제6,107,272호에 의하면, 두 가지 화학적 링커를 사용하여 EPO 동종이량체 (homodimer)를 제조하였다. 그러나, 이량체의 역가는 크게 떨어졌고 단지 반감기만 2-3배 증가하였다. 여기서도 이량체 형성으로 혈중 반감기는 증가하였지만 화학적 링커의 단점인 비특이적 결합과 활성감소가 크게 문제되었으며, 증가한 반감기보다 더 긴 반감기를 필요로 했다. 미국 특허 제5,738,846호는 생리활성을 증가시키기 위한 방법으로 분자량 8,000 PEG를 링커로 사용하여 인터페론 동종이량체를 만들었고 이로부터 비균질한 반응물을 얻었음을 개시하고 있다. 그러나, 상기 발명은 PEG가 인터페론 라이신 잔기에 비특이적으로 결합하였으며 균질하지 못한 이량체를 얻었고 활성 증가 효과도 뚜렷하지 않을 뿐만 아니라 혈중 안정성에 대한 언급도 없었다. 또한, 국제 특허 공개공보 제W0 92/16221호는 동종이량체가 아닌 이종이량체 (Heterodimer)를 보고하였는데, 상기 발명에 따르면 인터루킨-1 수용체 억제제 (IL-1ra)와 TNF 저해제를 분자량 10,000 PEG로 연결하였으며, 두 단백질 모두 유리-SH 그룹에 연결되었다. 그러나, 이 역시 TNF 억제 효과 또는 혈중 반감기에 대한 언급이 없으며, 단지 단백질의 활성 증가를 목적으로 한 커플링으로 볼 수 있고 혈중 안정성에 대한 의미는 없었다.

<16> 이에 본 발명자들은 동종이량체만으로는 혈중 안정성이 크게 증가할 수 없다는 문제점을 해결하기 위하여, 두 분자의 생리활성 폴리펩티드의 아미노 말단이 한 분자의 PEG 링커에 의

해 연결된 동종이량체를 형성하고, 상기 동종이량체를 구성하는 각각의 생리활성 폴리펩티드의 라이신 잔기의 아미노기에 한 분자씩의 PEG가 수식된 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체를 제조하고 상기 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체가 생체내 잔류 시간이 증가되어 생물학적 활성을 높은 수준으로 유지할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<17> 본 발명의 목적은 생리활성 폴리펩티드의 특정 부위에 작은 분자량의 PEG 링커 한 분자를 선택적으로 결합시켜 동종이량체를 만들고 큰 분자량의 PEG를 동종이량체에 다시 수식하여 생물학적 활성 저하를 최소화시키면서 생리활성 폴리펩티드의 안정성 및 체내 잔류 시간을 증가시켜 생체내 활성이 지속되는 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<18> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 두 분자의 생리활성 폴리펩티드의 아미노 말단이 한 분자의 PEG 링커에 의해 연결된 동종이량체를 형성하고, 상기 동종이량체를 구성하는 각각의 생리활성 폴리펩티드의 라이신 잔기의 아미노기에 한 분자씩의 PEG가 수식된 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체 및 그의 제조방법을 제공한다.

<19> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- <20> 본 발명은 폐길레이션에 의한 생물학적 활성 감소를 최소화면서 생리활성 폴리펩티드의 안정성 및 체내 잔류 시간을 증가시켜 생체내 활성이 지속되는 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종 이량체 결합체 및 그의 제조방법을 제공한다.
- <21> 본 발명에 따른 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체는
- <22> 1) 두 분자의 생리활성 폴리펩티드의 아미노 말단에 한 분자의 PEG 링커를 결합시켜 동종이량체를 형성하는 단계; 및
- <23> 2) 상기 동종이량체를 구성하는 각각의 생리활성 폴리펩티드의 라이신 잔기의 아미노기에 한 분자씩의 PEG를 수식하는 단계에 의해 제조될 수 있다.
- <24> 본 발명에 적용될 수 있는 생리활성 폴리펩티드로는 인간 성장호르몬 (hGH), 인터페론 (IFN), 과립구 증식인자 (G-CSF), 17번 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열을 갖는 과립구 증식인자 유도체 (17S-G-CSF 변이체), 적혈구 생성 촉진인자 (EPO), 인슐린, 인터루킨, GM-CSF 또는 종양괴사인자 수용체 (TNFR) 등을 예로 들 수 있으나, 이에 제한적인 것은 아니며 생체내 혈중 반감기를 증가시키기 위한 목적으로 다른 여러 생리활성 폴리펩티드들이 적용될 수 있다. 이하에서는 인간 성장 호르몬을 예로 들어 상세히 설명한다.
- <25> 생체내에서 인간 성장 호르몬이 그 역할을 수행하기 위해서는 목적 세포의 막에 존재하는 인간 성장 호르몬 수용체와 결합을 해야 하며 인간 성장 호르몬과 수용체와의 결합은 인간 성장 호르몬 내에 있는 2군데의 수용체 결합부위에 의해 이루어진다고 알려져 있다 (Cunningham et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3401, 1991). 이때, 인간 성장 호르몬의 아미노 말단은 수용체와의 결합에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있으므로 (Recent

Progress In Hormone Research 48:253, 1992), 본 발명에서는 동종이량체 형성시 PEG 링커 연결부위로 인간 성장 호르몬의 N-말단을 사용한다.

- <26> 본 발명에 유용한 인간 성장 호르몬과 이를 포함한 생리활성 폴리펩티드는 포유동물로부터 추출되거나, 화학적으로 합성될 수 있다. 또한, 유전자 재조합 기법을 이용하여 인간 성장 호르몬을 포함한 생리활성 폴리펩티드를 코딩하는 DNA로 형질전환된 원핵 또는 진핵 생물로부터 수득할 수도 있는데, 숙주로서 대장균 또는 효모를 이용하는 경우에는 인간 성장 호르몬 발현 산물은 초기 메티오닌 아미노산 잔기 (위치 -1)를 포함할 수 있다.
- <27> 상기 단계 1)의 PEG 링커는 생리적 환경과 동일한 수성 환경에서 침전되지 않도록 친수성을 띠어야 하며, 생리활성 폴리펩티드의 아미노 말단의 α -아미노기에 특이적으로 결합할 수 있도록 PEG 양쪽 말단에 화학적 반응기를 갖는 것이 바람직한데, 이러한 반응기로는 알데히드기 또는 프로피온 알데히드기가 특히 바람직하다. 또한, PEG 중합체의 분자량은, 이에 제한되는 것은 아니나, 1 내지 100 kDa이 바람직하고, 2 내지 20 kDa이 특히 바람직하다.
- <28> PEG 링커로 연결된 인간 성장 호르몬과 같은 생리활성 폴리펩티드의 동종이량체를 형성하기 위해, 환원제의 존재하에서 생리활성 폴리펩티드와 양쪽 말단에 알데히드 반응기를 갖는 PEG (ALD-PEG-ALD)를 반응시키는 페길레이션 반응을 수행한다. 페길레이션 반응에서 반응성과 이량체 생성을 최대화하기 위한 생리활성 단백질:PEG 링커의 반응 몰비는 1:0.25 내지 1:10의 범위일 수 있고, 1:0.5 내지 1:1이 바람직하다. 또한, 상기 페길레이션 반응은 필요에 따라 환원제의 존재 하에서 저온, 예를 들어 2 내지 10℃에서 수행하는 것이 바람직하다. 이때, 사용가능한

환원제로는 나트륨 시아노 보로하이드라이드 (NaCNBH_3), 수소화붕소나트륨, 디메틸아민 붕산염, 티메틸아민 붕산염, 트리메틸아민 붕산염, 피리딘 붕산염 등이 있다. 폐길레이션 반응을 수행한 후 SDS-PAGE를 수행하여 생리활성 폴리펩티드의 동종이량체 형성 여부를 확인할 수 있다. 이와 같이 형성된 생리활성 폴리펩티드 동종이량체를 수득하기 위해, 크기 배제 (size exclusion) 크로마토그래피 방법을 먼저 실시하여 반응하지 않은 생리활성 폴리펩티드를 제거한다. 이후 음이온 교환 크로마토그래피 방법을 이용하여 겔보기 전하의 차이를 통해 동종이량체로부터 N-말단에 PEG가 수식된 모노-PEG-생리활성 폴리펩티드 결합체를 분리 및 제거한다.

<29> 단계 2)에서 동종이량체 수식에 사용되는 PEG 중합체 분자는 통상적인 수용성 PEG 중합체 중에서 선택될 수 있으며, 통상적인 PEG 중합체로 단백질을 화학적으로 수식할 때 PEG의 활성화기에 따라 라이신 잔기의 ϵ -아미노기, 시스테인 잔기 또는 히스티딘 잔기에 결합할 수 있다. 한 분자의 생리활성 폴리펩티드에 한 분자의 PEG만 결합하도록 하기 위해 선택되는 PEG는 분자량이 1 내지 100 kDa이 바람직하고, 20 내지 40 kDa이 특히 바람직하다. PEG의 활성화기는 말레이미드 (maleimide) 그룹 및 석시나미드 (succinamide) 유도체가 있고, 석시나미드 유도체는 석시나미딜 프로피오네이트, 석시나미딜 카르복시메틸 또는 석시나미딜 카보네이트 등을 사용할 수 있다. 사용된 PEG는 분지되거나 분지되지 않을 수 있고, 바람직하게는 분지형 PEG가 수식 부위를 제한하는 것이 유리하다.

<30> 이와 같이 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체에 추가적으로 PEG를 수식한 후 다시 크기 배제 크로마토그래피 방법으로 동종이량체를 구성하는 각각의 두 생리활성 폴리펩티드에 PEG가 한 개씩 수식된 동종이량체-PEG 결합체를 분리한다.

<31> 본 발명에서 제조한 PEG 수식된 생리활성 폴리펩티드 동종이량체의 생물학적 활성을 측정하기 위해 여러 문헌 (Baldwin et al., *Acta Endocrinologica*. 119:326, 1988; Clark et al., *J. Biol. Chem.* 271(36):21969, 1996; Bozzola et al., *J. endocrinol. Invest.* 21:768, 1998)에 공지된 방법을 수행할 수 있다. 예를 들어, Nb2 세포주를 가지고 세포 증식 분석을 하여 시험관내의 활성을 측정하거나, 비변형 생리활성 폴리펩티드에 비해 생체내 활성이 지속적으로 유지되는지를 조사하기 위해 랫트를 이용한 몸무게 증가 시험을 통해 그 활성이 지속됨을 확인할 수 있다. 그 결과, 본 발명에 따라 제조된 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체는 비록 시험관내 활성은 감소하였지만 생체내 반감기가 현저하게 증가하여 체내 투여 후에도 생물학적 활성을 지속적으로 높은 수준으로 유지할 수 있음을 확인하였다.

<32> 이하 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명하고자 하나, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

<33> 실시예 1: 인간 성장 호르몬 동종이량체의 제조 및 정제

<34> 재조합 인간 성장 호르몬은 대한민국 특허 제316347호의 방법에 따라 제조하였고, 본 발명에 사용된 인간 성장 호르몬은 천연형 형태 (native form)이다. 이와 같이 제조된 인간 성장 호르몬을 5 mg/ml 농도로 100 mM 인산염 완충용액에 용해시켜 인간 성장 호르몬 용액을 준비하였다. 인간 성장 호르몬과 PEG 링커를 연결하기 위하여, 양쪽 말단에 알데히드 화학적 반응기를 가진 PEG 링커 ALD-PEG-ALD (분자량 3.4 kDa)(Shearwater Inc. 미국)를 인간 성장 호르몬 : PEG 링커의 물비가 1:0.5, 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 및 1:20이 되도록 정량하여 상기 인간

성장 호르몬 용액에 각각 첨가시키고, 환원제인 나트륨-시아노-보로하이드라이드 (NaCNBH_3)를 20 mM이 되도록 넣어주었다. 반응은 4℃에서 천천히 교반하면서 3시간 동안 진행시켰다. 인간 성장 호르몬의 아미노 말단 부위에 선택적으로 PEG 링커가 연결되고, 인간 성장 호르몬 두 분자가 1:1로 결합한 동종이량체 (hGH-PEG 링커-hGH)를 얻기 위하여 반응혼합물을 가지고 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피 (Superdex size exclusion chromatography) (Superdex 200, Pharmacia사)를 실시하였다. 완충용액으로 50 mM 나트륨-포스페이트 (pH 8.0)를 사용하여 hGH 동종이량체를 정제하였고, PEG 링커와 결합하지 않은 인간 성장 호르몬과 미반응한 PEG 링커를 제거하였다. 이로부터 반응성이 가장 좋고 부산물이 적은 인간 성장 호르몬 : PEG 링커 몰비의 최적 농도는 1:0.5 내지 1:2임을 확인하였다. 부분적으로 정제된 hGH 동종이량체 분획을 음이온 교환수지 컬럼으로 추가 정제하였다. 3 mL의 폴리왁스 엘피 (PolyWAX LP, Polywax Inc., 미국) 컬럼을 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 평형화시켰다. hGH 동종이량체 분획을 1 mL/분의 유속으로 컬럼상에 부하시킨 후, 5 CV, 즉 15 mL의 평형 완충용액으로 세척하였다. 10 CV (30 mL)의 1 M NaCl 완충용액으로 30분 동안 0에서 100%까지 자동 농도 구배 방법을 사용한 염 농도 구배 방법을 이용하여, hGH 동종이량체로부터 모노-PEG-hGH 결합체를 분리 및 제거하였다.

<35> 실시예 2: 40 kDa 분지형 PEG로 수식된 인간 성장 호르몬 동종이량체의 제조

<36> 실시예 1에서 정제된 hGH 동종이량체와 분자량 40 kDa인 분지형 NHS-PEG

(N-hydroxysuccinimidyl-PEG, Shearwater Inc., 미국)를 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 물비는 동종이량체 : PEG가 1:2, 1:5, 1:10 및 1:20이 되도록 정량하여 NHS-PEG를 넣어주고 반응

완충용액은 100 mM 나트륨-포스페이트 (pH 8.0)를 사용하였다. 반응 종료후 두 분자의 PEG가 결합된 동종이량체 (2PEG-동종이량체)를 정제하기 위하여 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피를 실시하였다. 완충용액은 PBS를 사용하였고 한 분자의 PEG가 결합된 동종이량체 (PEG-동종이량체)와 PEG가 수식되지 않은 동종이량체를 제거하였다. PEG-동종이량체와 2PEG-동종이량체의 함량비는 약 60% : 40%이었다. 이로부터 반응성이 가장 좋고 부산물이 적은 동종이량체 : PEG의 몰비는 1:10임을 확인하였다.

<37> 실시예 3: 40 kDa 분지형 PEG로 수식된 인터페론 동종이량체의 제조

<38> 실시예 1과 동일한 방법으로 인터페론 동종이량체 (IFN-PEG 링커-IFN)를 제조하였다.

이와 같이 제조된 IFN 동종이량체에 실시예 2와 동일한 방법으로 분자량 40 kDa NHS-PEG 두 분자를 라이신 잔기에 비특이적으로 결합시켰다. 두 분자의 PEG가 결합된 IFN 동종이량체 (2PEG-동종이량체)를 정제하기 위하여 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. PEG-동종이량체와 2PEG-동종이량체의 함량비는 약 60% : 40%이었다.

<39> 실시예 4: 40 kDa 분지형 PEG로 수식된 과립구 증식인자 동종이량체의 제조

<40> 실시예 1과 동일한 방법으로 과립구 증식인자 동종이량체 (GCSF-PEG 링커-GCSF)를 제조하였다. 이와 같이 제조된 GCSF 동종이량체에 실시예 2와 동일한 방법으로 분자량 40 kDa NHS-PEG 두 분자를 라이신 잔기에 비특이적으로 결합시켰다. 두 분자의 PEG가 결합된 GCSF 동종이량체 (2PEG-이량체)를 정제하기 위하여 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. PEG-이량체와 2PEG-이량체의 함량비는 약 60 % : 40 %이었다.

<41> 비교예 1: 40 kDa PEG로 수식된 인간 성장 호르몬 결합체의 제조

<42> 100 mM 인산칼륨 완충용액 (pH 6.0)에 인간 성장 호르몬 5 mg을 넣어 최종 부피 5 ml가 되도록 3개를 준비한 후, 분자량 40 kDa인 분지형 메톡시-PEG-알데히드 (Shearwater사, 미국)를 인간 성장 호르몬 : 메톡시-PEG-알데히드의 몰비가 1:4가 되도록 상기 용액에 넣어주었다. 상기 반응용액에 환원제인 NaCNBH_3 (Sigma사, 미국)를 최종 20 mM이 되도록 첨가한 후 4°C에서 18시간 동안 서서히 교반시키면서 반응시켰다.

<43> 아미노 말단에 PEG가 수식된 모노-PEG-hGH 결합체를 분리하기 위해 하기 과정을 실시하였다. 3 ml의 폴리왁스 엘피 (PolyWAX LP, Polywax Inc., 미국) 컬럼을 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 평형화시켰다. PEG화된 반응 혼합물을 1 ml/분의 유속으로 컬럼상에 부하시킨 후, 5 CV, 즉 15 ml의 평형 완충용액으로 세척하였다. 10 CV (30 ml)의 1 M NaCl 완충용액으로 30분 동안 0에서 100%까지 자동 농도 구배 방법을 사용한 염 농도 구배 방법을 이용하여 트리-, 디- 및 모노-PEG-hGH 순서로 용출시켰다.

<44> 모노-PEG-hGH 결합체 용출 분획을 가지고 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 10 mM 인산나트륨 완충용액 (pH 7.0)으로 평형화시킨 슈퍼덱스 200 (Superdex 200, Pharmacia사)에 상기 용출액을 농축하여 점적하였으며 동일한 완충용액으로 용출하였다. 이때, 유속은 1 ml/분으로 흘려주었다. 트리- 및 디-PEG-hGH는 모노-PEG-hGH보다 용출 시간이 상대적으로 빠르므로 이를 제거하여 순수한 모노-PEG-hGH만을 수득하였다.

<45> 비교예 2: 40 kDa PEG로 수식된 인터페론 및 과립구 증식인자 결합체의 제조

<46> 상기 비교예 1과 동일한 방법으로 분자량 40 kDa 분지형 메톡시-PEG-알데히드 (Shearwater사, 미국)를 인터페론과 과립구 증식인자의 N-말단에 각각 페길레이션시킨 후 순수한 모노-PEG-IFN과 모노-PEG-GCSF를 각각 분리, 정제하였다.

<47> 실험예 1: PEG 결합체의 정량 및 확인

<48> 상기 실시예 2 내지 4에서 제조된 PEG-hGH 동종이량체 결합체, PEG-IFN 동종이량체 결합체 및 PEG-GCSF 동종이량체 결합체와 비교예 1 내지 2에서 제조된 모노-PEG-hGH 결합체, 모노-PEG-IFN 및 모노-PEG-GCSF의 농도 및 순도는 쿠마시 (Coomassie) 염색, SDS-PAGE 및 크기 배제 크로마토그래피 (고압 액체 크로마토그래피)를 사용하여 측정하였고, 비어-람버트 (Beer-Lambert) 법칙에 따라 280 nm에서 단백질 농도를 측정하였다 (Bollag et al., *Protein Methods* Chapter 3, press in Wiley-Liss). hGH 동종이량체의 겔보기 분자량은 약 48 kDa이었고, 인터페론과 과립구 증식인자도 이와 유사한 크기를 보였다. 동종이량체가 하나의 40 kDa PEG로 수식되면 약 150 kDa, 두 개의 40 kDa PEG로 수식되면 약 240 kDa 겔보기 분자량을 보였다. 40kDa 모노-PEG-hGH 결합체의 겔보기 분자량은 약 120 kDa이었고, 인터페론과 과립구 증식인자 경우도 동일하였다.

<49> 도 1은 비변형 인간 성장 호르몬, hGH 동종이량체 및 PEG-hGH 동종이량체 결합체의 4 내지 20% 기울기 SDS-PAGE 겔 사진으로, 레인 1은 PEG-동종이량체 결합체, 레인 2는 비변형 인간 성장 호르몬, 레인 3은 분자량 표준 단백질 (Invitron사, 벤치마커, 아래 밴드부터 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 및 220 kDa), 및 레인 4는 동종이량체를 나타낸다. 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따라 제조된 PEG-hGH 동종이량체 결합체는 단일 밴드로 나타나 다른 단백질이 혼합되지 않은 매우 높은 순도를 가짐을 확인하였다.

<50> 실험예 2: 인간 성장 호르몬의 시험관내 활성 측정

<51> 인간 성장 호르몬의 세포내 활성을 비교하기 위하여, PEG-hGH 동종이량체 결합체 (실시예 2) 및 모노-PEG-hGH (비교예 1)의 시험관내 활성도를 인간 성장 호르몬 의존성 유사 분열을 하는 세포인 랫트 노드 림포마 (Rat node lymphoma) 세포주인 Nb2 (ECACC) 세포 (ECACC, European Collection of Cell Cultures, ECACC #97041101)를 이용하여 시험관내 분석을 통해 측정하였다. 상기 세포를 찢서 배양액 (Fisher's medium)에 10% 소 태아 혈청 (FBS, fetal bovine serum), 0.075% NaCO_3 , 0.05 mM 2-메르캅토에탄올 및 2 mM 글루타민이 첨가된 배양액에 배양한 후, 10% 소 태아 혈청을 제외한 동일한 조성의 배양액에서 24시간 동안 다시 배양하였다. 분석용 배양액에서 배양된 세포의 수를 세어 약 20,000개의 세포를 96웰 플레이트의 각 웰에 넣은 후 여기에 PEG-hGH 동종이량체 결합체와 모노-PEG-hGH, 대조군으로 국제 표준품 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) 및 비변형 인간 성장 호르몬 (HM-hGH)을 각각 희석하여 농도별로 첨가한 후 48시간 동안 37°C, CO_2 배양기에서 배양하였다. 이 후 세포의 성장 정도 (각 웰의 세포 수)를 측정하기 위해 세포 염색약 (cell titer 96 Aqueous One Solution; promega사, 미국)을 각 웰에 25 μl 씩 넣은 후, 4시간 동안 배양하였다. 이 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 각 시료의 역가를 계산하였다.

<52> 하기 표 1에서 보는 바와 같이, PEG에 의해 수식된 인간 성장 호르몬은 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여 떨어짐을 확인할 수 있다.

<53>

【표 1】

	농도 (ng/ ml)	시험관내 활성 (U/mg)	비변형 hGH에 대한 상대 적 활성 (%)
비변형 hGH	100	5.85E+06	100
NIBSC	100	5.02E+06	88.9
모노-PEG-hGH	100	4.65E+05	7.8
PEG-hGH 동종이량체 결합체	100	2.17E+04	0.8

<54> 실험예 3: 인터페론의 시험관내 활성 측정

<55> 인터페론 알파의 세포내 활성비교를 위하여, PEG-IFN 동종이량체 결합체 (실시예 3) 및 모노-PEG-IFN (비교예 2)의 항바이러스 활성을 수포성 구내염 바이러스로 포화시킨 마딘-다비 (Madin-Darby) 소 신장 세포 (MDBK, Madin Darby Bovine Kidney, ATCC CCL-22)를 사용하는 세포배양 생검으로 측정하였다. 이때, 폴리에틸렌 글리콜이 결합되지 않은 인터페론 알파 2b 국제 표준품 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)을 대조군으로 사용하였다.

<56> MDBK 세포를 MEM (minimum essential medium: JBI)에 10% FBS 및 1% 페니실린 스트렙토마이신이 첨가된 배지에서 37℃, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 측정하고자 하는 시료와 표준물질 (NIBSC 인터페론)을 일정 농도로 세포 배양 배지에 희석하여 96웰 플레이트의 각 웰에 100 µl씩 분주한 다음, 상기에서 배양된 세포를 플라스크에서 떼어내어 시료가 분주되어 있는 플레이트에 100 µl씩 가한 후, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 약 1시간 가량 배양하였다. 1시간 후 바이러스 농도가 5 내지 7 × 10³ PFU가 되도록 조절된 VSV (Vesicular stomatitis virus)를 50 µl씩 플레이트에 첨가시켜 주었다. 음성 대조군으로 시료 및 표준물질을 넣지 않고 세포와

바이러스만을 넣은 웰을, 양성 대조군으로 바이러스 희석 용액을 넣지 않고 세포만 넣은 웰을 만들었고, 모든 시험군은 37℃, 5% CO₂의 조건에서 약 16 내지 20시간 추가로 배양하였다.

<57> 배양액을 제거하고 살아있는 세포를 염색하기 위하여 웰에 뉴트랄 레드 (neutral red) 용액 100 μ l씩을 첨가하여 준 뒤, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 2시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거한 후 100% 에탄올과 1% 아세트산을 1:1로 섞어서 100 μ l씩 넣어주었다. 염색된 세포를 잘 흔들어서 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군을 블랭크 (blank)로 하고, 양성 대조군을 세포 성장 100%로 간주하여 50% 세포 성장 부분의 농도 (ED₅₀)를 계산하였다.

<58> 하기 표 2에서 보는 바와 같이, PEG에 의해 수식된 인터페론은 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여 떨어짐을 확인할 수 있다.

<59> 【표 2】

	농도 (ng/ml)	ED50 (IU/mg)	IFN에 대한 상대적 활성 (%)
IFN	100	4.24E+08	100
모노-PEG-IFN	100	1.02E+07	2.4
PEG-IFN 동종이량체 결합체	100	1.20E+05	0.03

<60> 실험예 4: 과립구 증식 인자의 시험관내 활성 측정

<61> 인간 골수 기원의 세포주인 HL-60 (ATCC CCL-240, Promyelocytic leukemia

patient/36 yr old Caucasian female)을 10% 소 태아 혈청을 포함하는 RPMI1640 배지에서 배양하다가, 세포의 숫자를 약 2.2×10^5 세포/ml이 되도록 조정 한 후, DMSO (dimethylsulfoxide, culture grade, SIGMA)를 최종 1.25% (v/v)가 되도록 첨가하였다. 상기 세포주를 96웰 플레이트 (Corning/low evaporation 96 well plate)에 90 μ l씩 넣어서 웰당 세포가 약 2×10^4 개가 되도록 한 후, 5% CO₂가 공급되는 37℃ 배양기에서 약 48시간 동안 배양하였다.

<62> 농도가 결정되어진 대조구 G-CSF 국제 표준품 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC), 모노-PEG-GCSF (비교예 3) 및 PEG-GCSF 동종이량체 결합체 (실시예 4) 각각을 동일한 농도가 되도록 적정한 비율로 RPMI 1640으로 희석하여 최종 농도가 500 ng/ml이 되도록 분주하였고, 이를 다시 두 배씩 연속적으로 RPMI 1640으로 10회씩 희석하였다.

<63> 이와 같이 준비된 시료를 배양 중인 HL-60 세포주의 각 웰에 10 μ l씩 가하여 최종 농도가 50 ng/ml부터 연속적으로 반감되도록 하였다. 처리한 세포주는 37℃ 배양기에서 48시간을 다시 배양하였다. 배양 후 세포주의 증가 정도를 알아보기 위해 CellTiter96™ (PROMEGA, cat # G4100)을 이용하여 증가한 세포주의 숫자를 670 nm 파장에서의 흡광도로 결정하여 분석을 완료하였다.

<64> 하기 표 3에서 보는 바와 같이, PEG에 의해 수식된 G-CSF는 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여 떨어짐을 확인할 수 있다. 그러나, 인간 성장 호르몬 또는 인터페론에서 볼 수 없는 상대적 활성을 보였다. 즉, 모노-PEG-GCSF 보다 본 발명의 PEG-GCSF 동종이량체 결합체의 상대적 활성이 약 4배 높게 나타나 동종이량체 형성에 의한 활성증가 효과를 볼 수 있다.

> 【표 3】

	ED50 (ng/ml)	G-CSF에 대한 상대적 활성 (%)
G-CSF	0.3	100
모노-PEG-GCSF	9.7	3.1
PEG-GCSF 동종이량체 결합체	2.5	12

66> 실험예 5: 약물동력학

67> 각 군당 5마리의 SD 랫트 (Rat)에게 천연형 생리활성 폴리펩티드 (대조군), 상기 실시예 2 내지 4에서 제조한 각 PEG-동종이량체 결합체 (시험군) 및 비교예 1 및 2에서 제조한 모노-PEG 결합체를 100 μ g/kg이 되도록 피하주사한 후, 대조군은 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30 및 48시간 후에 채혈하였고, 시험군은 주사 후 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96 및 120시간 후에 채혈하였다. 혈액시료는 헤파린을 함유하는 튜브에 모아서 응고를 방지하였고, 에펜도르프 고속 마이크로 원심분리기에서 5분간 원심분리하여 세포를 제거하였다. 혈장 내 용합 단백질 양을 각 생리활성 폴리펩티드 항체를 이용한 ELISA 방법으로 측정하였다.

<68> 도 2a, 2b 및 2c는 각 천연형 단백질과 PEG-동종이량체 결합체의 약물동력학 그래프를 나타낸 것으로, 상기 각각의 그래프로부터 천연형 단백질과 PEG-동종이량체 결합체의 혈중 반감기를 구하여 이를 하기 표 4에 나타내었다.

<69> 【표 4】

단백질	혈중 반감기 (시간)				
	천연형 단백질	모노-PEG 결합체		PEG-동종이량체 결합체	
		실시예	반감기(h)	실시예	반감기(h)
hGH	1.1	5	7.7	2	15.8
IFN	1.7	6	49.3	3	73.8
GCSF	2.8	6	4.3	4	8.9

1020030021122

70> 각 천연형 단백질에 대한 PEG-동종이량체 결합체의 혈중 반감기는 모노-PEG-결합체의 혈중 반감기보다 약 2배씩 증가하였다. 인간 성장 호르몬과 인터페론의 경우에는 PEG-동종이량체 결합체의 활성이 모노-PEG-결합체보다 감소하였지만 (과립구 증식인자의 PEG-동종이량체 결합체의 경우에는 모노-PEG-결합체 보다 약 4배 증가된 잔류활성을 보여주었다.), PEG-동종이량체 결합체의 증가된 혈중 반감기로 인해 생체내 활성에 주는 영향은 모노-PEG-결합체보다 오히려 더 우수할 수 있는데, 이는 하기 생체내 활성 측정을 통해 확인하였다.

<71> 실험예 6: 인간 성장 호르몬의 생체내 활성 측정

<72> 뇌하수체가 제거된 5주령의 수컷 랫트 (hypsectomized Sprague Dawley rat, SLC사, 일본)를 이용한 몸무게 증가 시험을 통해 PEG-hGH 동종이량체 결합체 및 모노-PEG-hGH 결합체의 생체내 활성도를 측정하여 비교하였다. 용매 대조군과 비변형 인간 성장 호르몬, 그리고 각각의 PEG-hGH 결합체를 랫트의 경배부 피하에 하기 표 5와 같은 투여농도 및 용량으로 26G 주사기 (1 ml, ㈜한국백신)를 이용하여 투여하였다. 투여 전 및 투여 16시간 이후 체중을 측정하였고 최종 투여 24시간 이후에 에테르 마취로 치사시켜 육안으로 뇌하수체의 잔존유무를 검사하여 뇌하수체의 잔존물이 관찰된 개체의 결과는 제외시켰다.

<73> 【표 5】

투여약물	동물수	투여용량	투여방법
용매대조군	5	PBS (0.5 ml)	1회/하루, 6일간 투여
표준품 hGH	5	60 mIU (30 μ g/회)	1회/하루, 6일간 투여
모노-PEG-hGH	5	360 mIU (180 μ g/회)	1회 투여
PEG-동종이량체 결합체	5	360 mIU (180 μ g/회)	1회 투여

<74> 각 시료의 투여 후 몸무게 증감의 결과는 도 3에 나타내었다. 표준품으로 사용한 비변형 인간 성장 호르몬은 하루에 1회씩 6일간 매일 투여하였고 투여기간 동안 일정한 비율로 몸무게의 증가가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 비변형 인간 성장 호르몬이 지속적으로 생체내 활성을 갖기 위해서는 매일 투여해야 함을 잘 나타내고 있다. 모노-PEG-hGH 결합체를 1회 투여하였을 경우 투여 후 3일까지 지속적으로 몸무게가 증가되었으나, 3일 이후부터는 몸무게 증가율이 둔화되어 5일 이후에는 감소됨을 볼 수 있었다. 그러나, PEG-hGH 동종이량체 결합체를 1회 투여하였을 경우 몸무게 증가 추세가 모노-PEG-hGH 보다 완만함을 보였고, 매일 1회씩 투여한 비변형 인간 성장 호르몬의 몸무게 증가추세와 매우 유사한 양상을 나타내었다. 또한, 5일 이후에도 몸무게는 계속적인 증가 추세를 나타내었다. 서방형 제제의 목적은 1회 투여로 매일 1회씩 투여했을 때와 동일한 생체내 효과를 얻는 것이므로, 인간 성장 호르몬 서방형 제제로서의 효과는 시험관내 활성이 낮은 PEG-hGH 동종이량체 결합체가 모노-PEG-hGH 보다 더 뛰어나다고 할 수 있다. 이러한 결과는 서방형 제제 개발시 시험관내 활성이 어느 정도 낮더라도 생체내에서 지속적인 효과를 유지하는데는 중요하지 않기 때문에 증가된 혈중 반감기가 반드시 필요하고 활성을 나타내는 최소한의 역가 유지를 고려해야 한다고 볼 수 있다. 생리 활성 폴리펩티드 종류에 따라 동종이량체 효과는 약간 다르게 나타나며, 본 발명에서도 과립구 증식인자의 경우 동종이량체를 형성하면 모노-PEG-결합체 보다 약 4배정도 잔류활성이 높아져 가장 효과적인 동종이량체 효과를 볼 수 있었다.

【발명의 효과】

<75> 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체는 PEG 링커를 이용하여 혈중 반감기가 짧은 생리활성 폴리펩티드의 동종이량체를 제조한 후 다시 생리활성 폴리펩티드의 라이신 잔기의 아미노기를 PEG로 수식한 것으로, 생리활성 폴리펩티드의 혈중 반감기를 증가시켜 생리활성을 개선시키면서도 면역 반응 유발의 위험이 없어 서방형 방출 제형의 제조에 유용하게 적용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

- 1) 두 분자의 생리활성 폴리펩티드의 아미노 말단이 한 분자의 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycol, PEG) 링커에 의해 연결된 동종이량체 (homodimer)를 형성하는 단계; 및
- 2) 상기 동종이량체를 구성하는 각각의 생리활성 폴리펩티드의 라이신 잔기의 아미노기에 한 분자의 PEG를 수식하는 단계에 의해 제조된 PEG-생리활성 폴리펩티드 동종이량체 결합체.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

생리활성 폴리펩티드가 인간 성장호르몬 (hGH), 인터페론 (IFN), 과립구 증식인자 (G-CSF), 17번 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열을 갖는 과립구 증식인자 유도체 (17S-G-CSF 변이체), 적혈구 생성 촉진인자 (EPO), 인슐린, 인터루킨, GM-CSF 및 종양괴사인자 수용체 (TNFR)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 결합체.

【청구항 3】

제 1항에 있어서,

단계 1)에서 PEG 링커가 양쪽 말단에 알데히드기 또는 프로피온 알데히드기를 갖는 것을 특징으로 하는 결합체.

【청구항 4】

제 1항에 있어서,

PEG 링커가 분자량이 1 내지 100 kDa 달톤인 것을 특징으로 하는 결합체.

【청구항 5】

제 4항에 있어서,

PEG 링커가 분자량이 2 내지 20 kDa 달톤인 것을 특징으로 하는 결합체.

【청구항 6】

제 1항에 있어서,

단계 2)에서 동종이량체에 수식되는 PEG가 석시니미딜 프로피오네이트, 석시니미딜 카르복시메틸, 석시니미딜 카보네이트 및 말레이미드 (maleimide)로 구성된 군으로부터 선택되는 작용기를 한쪽 말단에 갖는 것을 특징으로 하는 결합체.

【청구항 7】

제 1항에 있어서,

단계 2)에서 동종이량체에 수식되는 PEG가 분지형 또는 선형인 PEG인 것을 특징으로 하는 결합체.

【청구항 8】

제 1항에 있어서,

단계 2)에서 동종이량체에 수식되는 PEG가 분자량이 1 내지 100 kDa 달톤인 것을 특징으로 하는 결합체.

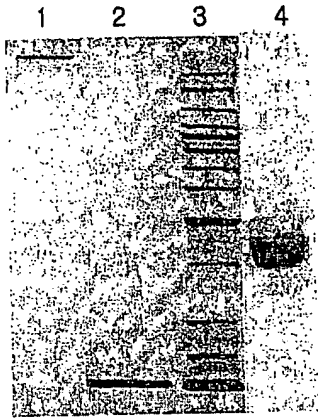
【청구항 9】

제 8항에 있어서,

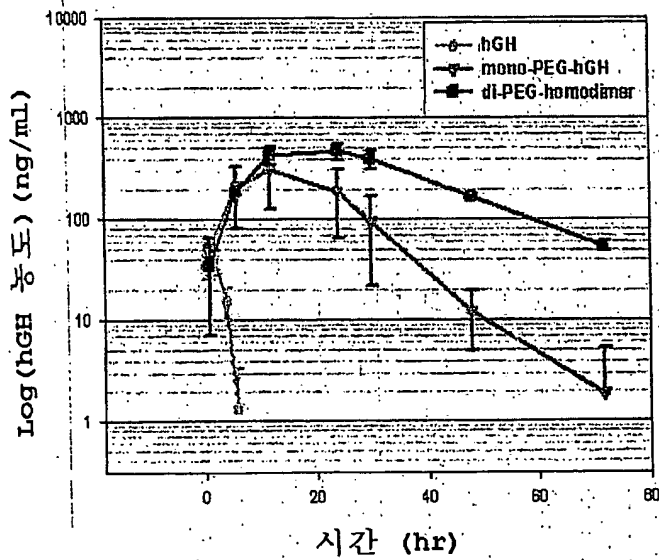
PEG가 분자량이 20 내지 40 kDa 달톤인 것을 특징으로 하는 결합체.

【도면】

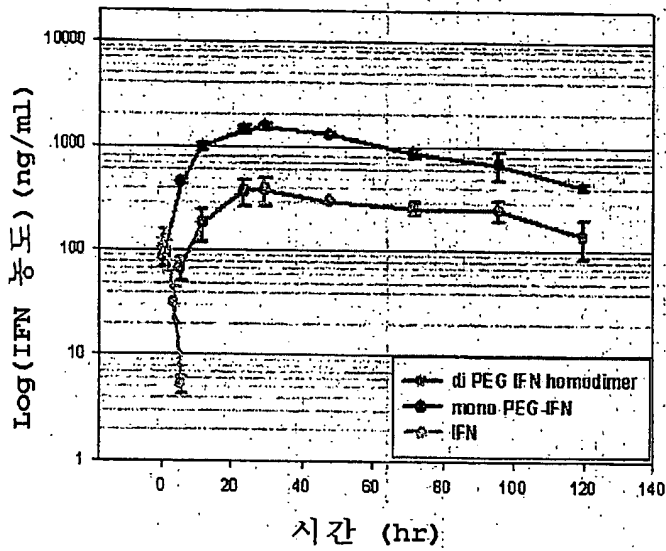
【도 1】



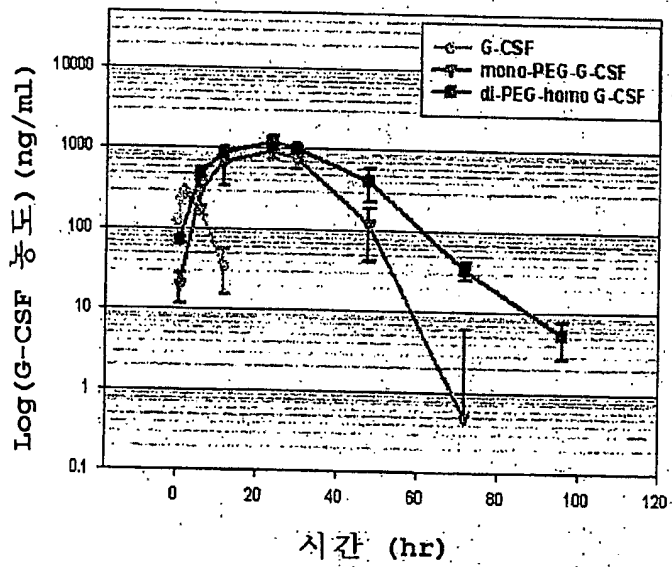
【도 2a】



【도 2b】



【도 2c】



【도 3】

